

INFLUENCIA DE LA MADUREZ SEXUAL Y LA CASTRACION SOBRE LA ACTIVIDAD ELECTRICA CARDIACA EN CONEJOS MACHOS Y HEMBRAS

GABRIELA Y. EIZIKOVITS¹, CAROLINA CASAL¹, PEDRO D. ARINI^{2, 3}, GUILLERMO C. BERTRAN¹

¹Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires,

²Instituto Argentino de Matemática Alberto Calderón, CONICET, Buenos Aires, ³Instituto de Ingeniería Biomédica, Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires

Resumen Es bien conocida la existencia de diferencias en la actividad eléctrica cardíaca asociadas al sexo. Si bien estas diferencias habitualmente se relacionan al efecto de la madurez y de las hormonas sexuales gonadales, todavía existen controversias al respecto. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que la madurez sexual y la castración producen sobre los distintos parámetros del electrocardiograma de superficie y de la duración de los potenciales de acción (DPA). Se utilizaron conejos jóvenes (menores de un mes de edad) y adultos (mayores de seis meses de edad). Las diferencias obtenidas en las hembras se observan en la repolarización tardía, mientras que en los machos ocurren en la repolarización temprana. Existiría una relación entre las diferencias observadas en la duración desde el pico máximo hasta el fin de la onda T (T_{pt}) y las observadas en la DPA al 90% de la repolarización (DPA_{90}) en las hembras, mientras que en los machos la relación existe entre la duración desde el punto J hasta el pico máximo de la onda T (JT_p) y la DPA al 30 y 50% de la repolarización (DPA_{30} y DPA_{50}). Si bien existen diferencias que podrían ser debidas a factores hormonales otras serían debidas a factores no hormonales.

Palabras clave: actividad eléctrica cardíaca, madurez sexual, hormonas sexuales

Abstract *Influence of sexual maturity and gonadectomy on cardiac electrical activity in male and female rabbits.* Sex-associated differences in cardiac electrical activity have already been documented. Even though these differences are usually associated with the effect of maturity and sex hormones, there are still some controversial points to this respect. The aim of this study was to evaluate the effects of maturity and gonadectomy on the different parameters of surface electrocardiogram and the duration of the action potential in young and adult rabbits. The differences obtained in females were observed in late repolarization, whereas in males took place in early repolarization. There was a relationship between the differences observed in the duration from the peak to the end of the T wave and those observed in the duration of the action potential to 90% of repolarization in females, whereas in males the relationship exists between the duration from the point J to the peak of the T wave and the duration of the action potential at 30 and 50% of repolarization. Differences could be related to hormonal or non-hormonal factors.

Key words: cardiac electrical activity, sexual maturity, sex hormones

Desde hace muchos años se ha demostrado que existen diferencias en la actividad eléctrica cardíaca entre machos y hembras. Recientemente ha habido un aumento de las evidencias del efecto que la madurez y las hormonas sexuales provocan sobre la repolarización ventricular cardíaca y sobre las arritmias. Por ejemplo, en humanos se ha descrito una mayor duración de la repolarización ventricular, reflejada por un intervalo QT prolongado y

una onda T de baja amplitud que caracterizan al patrón electrocardiográfico femenino comparado con el patrón masculino¹. Estas diferencias podrían explicar la mayor incidencia de determinados síndromes en un sexo frente al otro. En este sentido, ha sido reconocida una mayor susceptibilidad en la mujer para el desarrollo de arritmias ventriculares malignas, como la taquicardia ventricular polimorfa tipo Torsión de Puntas, en aquellas situaciones clínicas que se acompañan de una prolongación anormal del intervalo QT², mientras que por otro lado se ha descrito una mayor incidencia de fibrilación auricular o muerte súbita cardíaca en los hombres³ en comparación a lo que ocurre en las mujeres. Dichas observaciones han llevado actualmente a plantear la posibilidad de desarrollar medicamentos específicos para hombres y para mujeres⁴.

Recibido: 11-XI-2009

Aceptado: 19-V-2010

Dirección postal: Dr. Guillermo Bertran, Laboratorio de Neurofisiología, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Combatientes de Malvinas 3150, 1427 Buenos Aires, Argentina

Fax: 54-11-4523-8947

e-mail: guillermo.bertran@gmail.com

Los mecanismos que provocan dichas diferencias no están completamente dilucidados en la actualidad, aunque existen cada vez más evidencias de que las hormonas sexuales juegan un papel central. En los humanos, la falta de efectos significativos sobre el intervalo QT en la terapia hormonal de reemplazo en mujeres posmenopáusicas, la ausencia de modificaciones en la duración del intervalo QT durante el ciclo menstrual y la disminución de las diferencias en la repolarización entre hombres y mujeres a medida que se incrementa la edad de la población⁵, podrían contribuir significativamente a plantear como hipótesis que los andrógenos desempeñan un papel fundamental en la modulación de la repolarización cardíaca y podrían constituir la base de las diferencias ligadas al sexo. Dichos efectos también han sido observados al utilizarse ratas como modelo experimental⁶.

Con respecto a los potenciales de acción (PA), ha sido descrita en conejos una mayor duración en las hembras (tanto al 30 como al 50 y 90% de su repolarización), comparados con los de los machos. Este efecto se observó tanto al comparar entre hembras y machos adultos controles, como cuando fueron utilizados animales castrados suplementados con hormonas femeninas o masculinas. Aquellos suplementados con hormonas femeninas presentaban una duración del PA (DPA) mayor que los suplementados con hormonas masculinas⁷.

Por el lado de las corrientes de membrana, se han encontrado varias diferencias en distintos canales de membrana. Se ha descrito una disminución de las corrientes repolarizantes de potasio (I_{Ks} , I_{Kr} e I_{K1}) en hembras adultas en comparación con lo observado en machos adultos. Este efecto también ha sido observado frente a la administración de hormonas femeninas. Estas diferencias en las corrientes repolarizantes, podrían explicar la distinta duración de los PA observada entre machos y hembras, no sólo en humanos sino también en ratones, conejos y cobayos⁸.

A pesar de la gran cantidad de información acerca de la influencia de la madurez sexual sobre la actividad eléctrica cardíaca y sus mecanismos de acción, todavía quedan por dilucidar algunos interrogantes e incluso existe bibliografía con resultados contradictorios en varios aspectos. Si bien se asume que las hembras tienen un intervalo QT más prolongado que los machos (hecho descrito en humanos, conejos y otras especies) también existen comunicaciones que muestran intervalos QT similares entre ambos sexos⁹. Con respecto al papel que juegan las hormonas sexuales, si bien muchas de las citas bibliográficas sugieren que los efectos observados son consecuencia de la acción de las hormonas masculinas, existen publicaciones que aportan información sobre el efecto de las hormonas femeninas, como ha informado Tanabe et al. en cobayos¹⁰. También existe bibliografía que estaría demostrando que algunos de esos efectos son producidos por efectos no hormonales que aún no han sido bien estudiados, hecho

mostrado por distintos autores utilizando el conejo como modelo experimental^{11, 12}.

Además, muchos de los experimentos publicados utilizan animales adultos castrados a los cuales se suplementa con *pellets* de las distintas hormonas sexuales (tanto masculinas como femeninas). De este modo, los niveles hormonales alcanzados en esta forma quedan fuera del rango fisiológico¹³, poniendo en duda algunos de los resultados obtenidos. Por último, otro de los interrogantes que plantea este tipo de experimentos es el hecho de utilizar animales adultos castrados como grupo control, los que antes de la castración tuvieron niveles hormonales comparables con adultos normales. Esto no deja claro si los cambios observados por estos autores son en parte debidos al efecto que la castración produce sobre la repolarización cardíaca, o en parte debidos a cambios estructurales que pudieron producir dichas hormonas durante el normal crecimiento de los animales y que no desaparecen luego de la castración.

En esta investigación proponemos evaluar, en un modelo fisiológico simple, la influencia que la madurez sexual y la castración tienen sobre diversas variables del electrocardiograma (ECG) de superficie y del PA en conejos machos y hembras. El efecto de la madurez sexual se evaluará comparando los resultados obtenidos entre animales jóvenes y adultos de ambos sexos. Por otro lado, la comparación entre animales adultos y castrados nos permitirá inferir los efectos debidos a algún factor gonadal (por ejemplo, las hormonas sexuales gonadales). Además, si los resultados observados fueran diferentes entre ambos sexos, permitirían poner en evidencia posibles efectos diferenciales de estos factores gonadales sobre la actividad eléctrica cardíaca.

Materiales y métodos

Se utilizaron conejos *New Zealand* ($n = 40$) separados en 2 grupos: adultos (más de 6 meses de edad, es decir luego de alcanzar la madurez sexual) y jóvenes (menos de un mes de edad, o sea prepúberes). Estos grupos fueron seleccionados teniendo en cuenta la evolución de los niveles de hormonas gonadales desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad en los conejos *New Zealand*¹⁴⁻¹⁶. Cada uno de estos grupos, a su vez, fue subdividido de acuerdo al sexo: machos jóvenes (MJ, $n = 8$), hembras jóvenes (HJ, $n = 8$), machos adultos (MA, $n = 7$) y hembras adultas (HA, $n = 7$). A éstos se agregó un tercer grupo de animales, compuesto por conejos adultos que fueron castrados y evaluados al menos 20 días después de la castración. Este último grupo también fue dividido de acuerdo al sexo: machos castrados (MC, $n = 5$) y hembras castradas (HC, $n = 5$).

Se evaluó el ECG de superficie obtenido con el animal anestesiado. Se registró la derivación precordial que presentó una onda T de máxima amplitud. Una vez estabilizado el registro electrocardiográfico, se adquirieron 20 latidos consecutivos, los cuales posteriormente fueron promediados. Las variables fueron corregidas utilizando una modificación de la corrección de Bazett. Se midieron las siguientes variables (Fig. 1, panel superior):

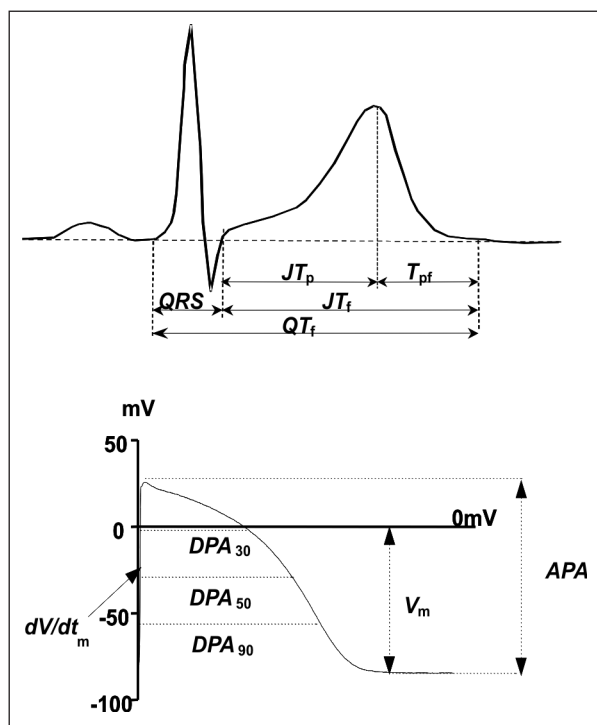


Fig. 1.— Panel superior: variables de duración medidas en el electrocardiograma de superficie. Panel inferior: variables medidas en el potencial de acción. (Descripción más detallada en el texto).

Intervalo QRS : intervalo medido en milisegundos desde el inicio hasta el fin del complejo QRS, como indicador de la despolarización ventricular cardíaca.

Intervalo QT_t : intervalo medido en milisegundos desde el inicio del complejo QRS hasta el fin de la onda T, como indicador de la despolarización y repolarización ventricular cardíaca.

Intervalo JT_t : intervalo medido en milisegundos desde el punto J hasta el fin de la onda T, como indicador de la duración total de la repolarización ventricular.

Intervalo JT_p : intervalo medido en milisegundos desde el punto J hasta el pico máximo de la onda T, como indicador de la repolarización ventricular temprana.

Intervalo T_{pt} : intervalo medido en milisegundos desde el pico máximo hasta el fin de la onda T, como indicador de la repolarización ventricular tardía.

Los datos del ECG fueron registrados usando un amplificador de instrumentación con ganancia $\times 1000$ y un ancho de banda de 0.05-300 Hz. Las señales del ECG fueron muestreadas a una frecuencia de 1 kHz y 12 bits de resolución empleando una placa convertora A/D (Lab PC+, National Instruments). Se empleó un filtro notch de 50 Hz para filtrar el ruido de línea eléctrica. El movimiento de línea de base fue compensado empleando un algoritmo de Cubic Spline¹⁷. El complejo QRS fue detectado utilizando el algoritmo descrito por Pan et al¹⁸. Posteriormente, el pico, el fin de la onda T y el punto J se detectaron empleando un algoritmo basado en umbrales de la señal electrocardiográfica derivada¹⁹.

Luego de la obtención del registro electrocardiográfico, los mismos animales fueron utilizados para el registro de los PA. Dichos animales se anestesiaron con tiopental sódico y ketamina intravenosos y luego se ventilaron mecánicamente. Los corazones fueron rápidamente removidos y sumergidos

en solución Tyrode fría y oxigenada. Mediante una disección se obtuvieron trozos de tejido de $10 \times 10 \times 1$ mm de la superficie endocárdica del ventrículo izquierdo. Los tejidos fueron colocados en un baño, perfundidos con solución Tyrode equilibrada a pH 7.4. La temperatura se mantuvo a 37 ± 0.5 °C. La composición de la solución Tyrode expresada en mM es: 136.5 ClNa, 2.7 ClK, 1 Cl₂Mg, 0.33 NaH₂PO₄, 5.55 glucosa, 2 Cl₂Ca y 5 HEPES, equilibrada con O₂ al 100%.

Los tejidos fueron estimulados a distintas frecuencias de estimulación con pulsos rectangulares de 2 milisegundos de duración y con una intensidad igual al doble del umbral diastólico, mediante un estimulador programable a través de un electrodo bipolar de plata recubierto con teflón excepto en sus extremos.

En cada tejido se registraron PA obtenidos en la superficie endocárdica, a 4 diferentes frecuencias interestímulo (300, 500, 1000 y 5000 milisegundos), analizándose las siguientes variables (Figura 1, panel inferior):

DPA_{30} , DPA_{50} y DPA_{90} : duración del PA al 30, 50 y 90% de la repolarización.

APA: amplitud del PA.

dV/dt_m : pendiente de subida máxima del PA.

V_m : potencial de reposo.

Para registrar los PA de la superficie celular se usaron microelectrodos de vidrio llenos con ClK 3M, conectados a un amplificador (Axioclamp) de alta impedancia. Luego de cada cambio en la frecuencia de estimulación, se dejó que la preparación alcanzara el estado estacionario antes de proceder con la adquisición de los PA.

En cada experiencia se registraron simultáneamente los PA provenientes de un macho y de una hembra para evitar que posibles variaciones en las condiciones experimentales afectaran los resultados obtenidos.

Las señales fueron monitoreadas en un osciloscopio y digitalizadas a 10 kHz con una precisión de 12-bits a través de una placa de adquisición analógico-digital. La adquisición se realizó a través del software pClamp mientras que el filtrado y el procesamiento de las señales se efectuó mediante un software desarrollado en Matlab bajo Windows.

De cada conejo se obtuvieron 2 ml de sangre y el suero fue almacenado a -20 °C para su análisis posterior. Los niveles hormonales de estradiol fueron determinados utilizando un inmunoensayo quimioluminiscente de fase sólida (Immulite, Diagnostic Products Co, DPC), mientras que para los niveles de testosterona se utilizó un radioinmunoensayo (Diagnostic Systems Laboratories).

Todos los datos están expresados como media \pm ES. El análisis estadístico se realizó utilizando el análisis de varianza (ANOVA) y un post test de Bonferroni. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

En la Fig. 2 se observan los resultados obtenidos en el ECG. En el panel superior se muestran las variables correspondientes a las hembras en el siguiente orden: hembra joven (HJ), hembra adulta (HA) y hembra castrada (HC), mientras que en el panel inferior aparecen las variables correspondientes a los machos siguiendo el mismo orden (MJ, MA y MC).

Con respecto a las hembras, observamos que sólo aparecen diferencias significativas en el T_{pt} de las hembras adultas con respecto a las hembras jóvenes y a las hembras castradas, mientras que el resto de

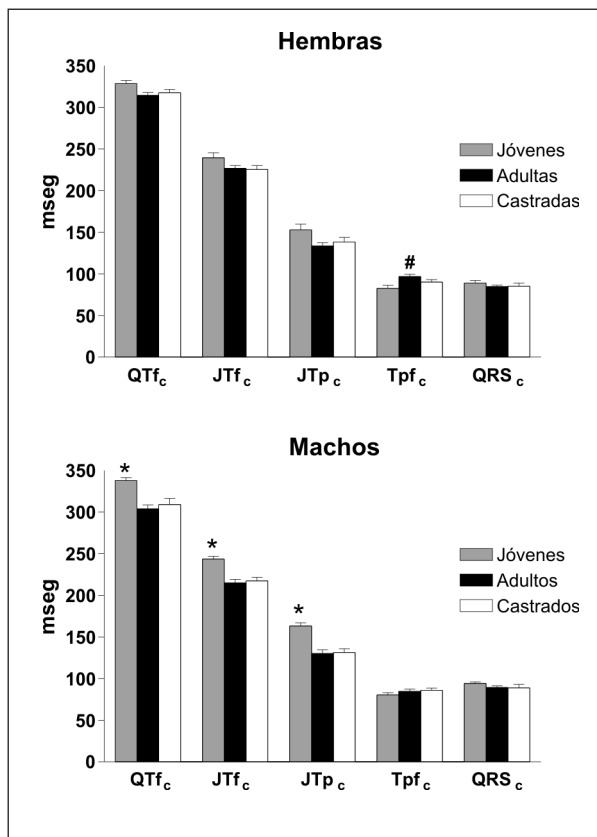


Fig. 2.— Resultados de las variables del electrocardiograma de superficie. Panel superior: comparación de las variables obtenidas entre hembras jóvenes, adultas y castradas. Panel inferior: comparación de las variables obtenidas entre machos jóvenes, adultos y castrados. # $p < 0.05$ Animales Adultos con respecto a animales Jóvenes y Castrados; * $p < 0.05$ Animales Jóvenes con respecto a animales Adultos y Castrados.

las variables no muestran diferencias estadísticamente significativas.

Por el lado de los machos, podemos observar que el QT_p , el JT_i y JT_p de los machos jóvenes es significativamente más largo que los correspondientes al de los machos adultos y castrados, mientras que no se observan diferencias en el T_{pf} ni en el QRS.

En la Fig. 3 podemos observar PA representativas correspondientes a HJ, HA y HC (panel superior) y MJ, MA y MC (panel inferior) a una frecuencia interestímulo de 500 milisegundos.

En la Fig. 4 se observan los resultados correspondientes a los DPA_{30} , DPA_{50} y DPA_{90} correspondientes a las hembras (gráficos del panel superior) y machos (gráficos del panel inferior). Las diferentes columnas están distribuidas en el mismo orden descrito para los registros electrocardiográficos (HJ, HA, HC y MJ, MA, MC).

Se puede observar una alta dependencia en la duración de los PA con respecto a la frecuencia de estimula-

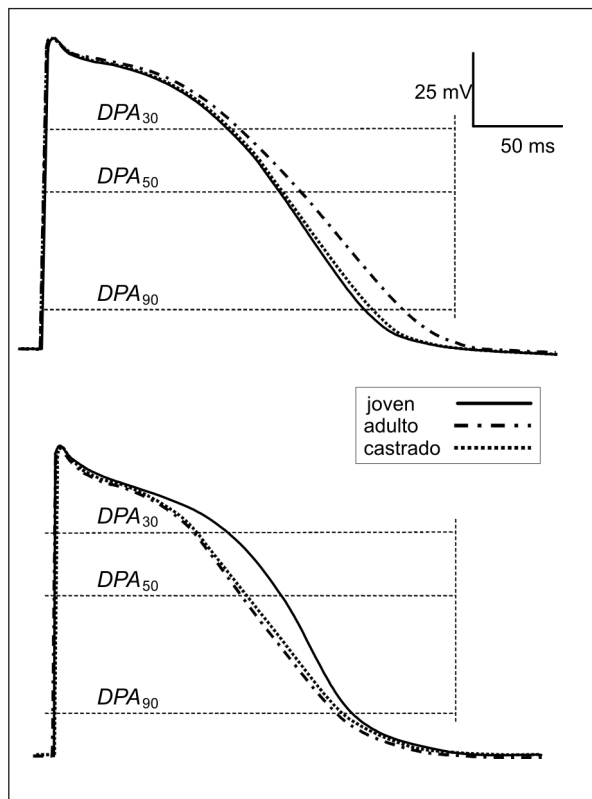


Fig. 3.— Potenciales de acción representativos, obtenidos a una frecuencia interestímulo de 500 milisegundos correspondientes a: HJ, HA, HC (panel superior) y MJ, MA y MC (panel inferior). Valores de V_m (en mV): HJ: -82.3, HA: -81.7, HC: -85.4 mV, MJ: -83.6, MA: -77.1, MC: -84.8.

ción en todos los grupos experimentales tanto de machos como de hembras. Las duraciones máximas se obtuvieron a frecuencias de 500 y 1000 milisegundos y presentaron valores menores tanto a frecuencias más largas (5000 milisegundos) como más cortas (300 milisegundos).

Con respecto a las hembras, se puede observar que las hembras adultas presentaron una DPA_{90} significativamente más larga que la correspondiente a las hembras jóvenes y castradas, a intervalos de estimulación de 500, 1000 y 5000 milisegundos. Por el lado de los machos, observamos que los machos jóvenes presentaron un DPA_{30} y una DPA_{50} significativamente más larga que la de los machos adultos y castrados en todas las frecuencias de estimulación.

En la Fig. 5 se grafican los resultados obtenidos en dV/dt_m , V_m y APA . Observamos que los machos jóvenes presentaron un dV/dt_m significativamente más largo que el de los machos adultos y castrados. Además, los machos adultos presentaron un V_m significativamente menos negativo que el correspondiente a los machos jóvenes y castrados. Estos efectos se observaron en todos los intervalos de estimulación.

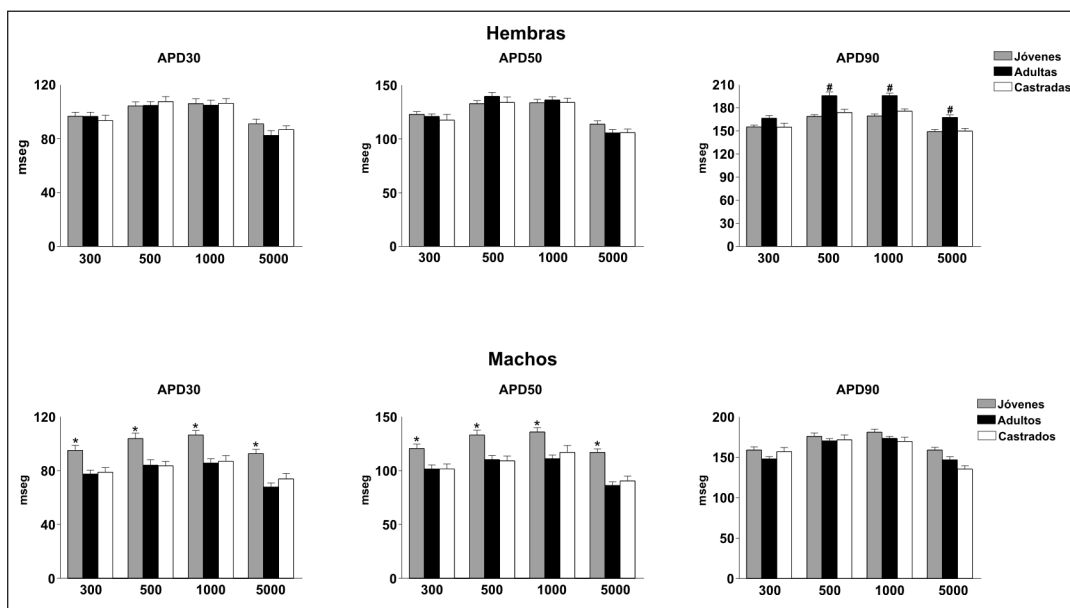


Fig. 4.— Resultados de las variables de duración de los potenciales de acción obtenidos para intervalos de estimulación de 300, 500, 1000 y 5000 milisegundos. Panel superior: comparación de las variables obtenidas entre hembras jóvenes, adultas y castradas. Panel inferior: comparación de las variables obtenidas entre machos jóvenes, adultos y castrados. # $p < 0.05$ animales adultos con respecto a animales jóvenes y castrados; * $p < 0.05$ animales jóvenes con respecto a animales adultos y castrados.

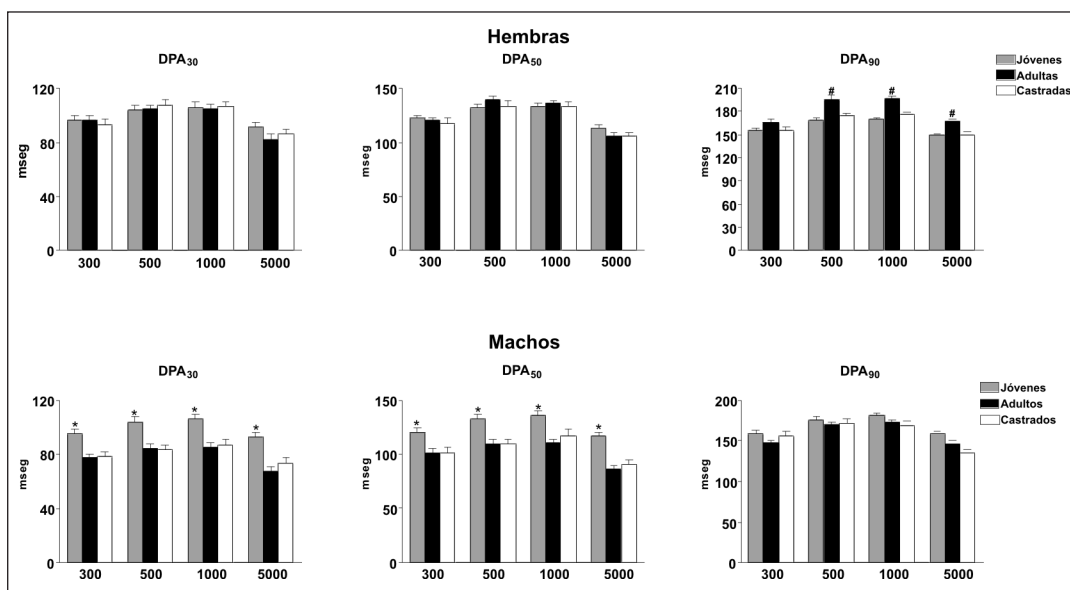


Fig. 5.— Resultados de dV/dt_m , V_m y APA de los potenciales de acción obtenidos para intervalos de estimulación de 300, 500, 1000 y 5000 milisegundos. Panel superior: comparación de las variables obtenidas entre hembras jóvenes, adultas y castradas. Panel inferior: comparación de las variables obtenidas entre machos jóvenes, adultos y castrados. # $p < 0.05$ Animales adultos con respecto a animales jóvenes y castrados; * $p < 0.05$ Animales jóvenes con respecto a animales adultos y castrados.

Por último, no se observaron diferencias significativas en el dV/dt_m ni en el V_m correspondiente a las hembras, como tampoco en los valores de APA evaluados en ambos sexos.

Los valores de testosterona (expresados en media \pm ES) fueron: 0.24 ± 0.17 , 6.4 ± 1.2 , 0.05 ± 0.02 , $0.37 \pm$

0.015 , 1.48 ± 0.60 y 0.84 ± 0.09 ng/ml para HA, MA, HJ, MJ, HC y MC, respectivamente. Los niveles plasmáticos de testosterona en MA fueron significativamente diferentes de los medidos en MJ y MC.

Por otro lado, los niveles de estradiol no fueron significativamente diferentes entre los distintos grupos como

ha sido informado previamente¹⁴ y publicado en varios artículos^{6, 11, 13, 20}.

Discusión

Este trabajo está basado en la comparación de la actividad eléctrica cardíaca entre sexos, tanto a nivel del potencial de acción como del electrocardiograma de superficie, utilizando animales jóvenes, adultos y castrados. Con las diferencias observadas entre individuos jóvenes y adultos analizamos el efecto de la madurez sexual, mientras que la comparación entre animales adultos y castrados permitió evaluar el efecto de algún factor gonadal. Los hallazgos más importantes de este trabajo se resumen en que: a) existen diferencias entre sexos en la actividad eléctrica cardíaca, tanto a nivel del ECG de superficie como en los PA, debidas a la influencia de la madurez sexual, b) en las hembras estas diferencias electrocardiográficas se observan en la fase tardía de la repolarización ventricular y en la DPA_{90} mientras que en los machos ocurren en la fase temprana de la repolarización ventricular y en la DPA_{30} y DPA_{50} , c) en las hembras estas diferencias son revertidas con la castración sugiriendo la influencia de algún factor gonadal, mientras que en los machos la gran mayoría de dichas diferencias no fueron revertidas con la castración lo cual estaría sugiriendo un efecto debido a factores no hormonales.

El intervalo T_{pf} de las hembras adultas fue significativamente mayor que el de las jóvenes, mientras que los intervalos JT_p , JT_p y QT_i de los machos adultos fueron significativamente más cortos que los de los jóvenes. Dado que no se encontraron diferencias ni en el QRS ni en el intervalo T_{pf} de los machos, podemos inferir que las diferencias nombradas anteriormente están centradas en el intervalo JT_p . Del análisis de las diferencias encontradas en las distintas variables del ECG es posible deducir que la influencia de la madurez sexual se presenta en las hembras en la fase tardía de la repolarización ventricular (intervalo T_{pf}), mientras que en los machos es observada en la fase temprana de la repolarización ventricular (intervalo JT_p). La mayor duración del T_{pf} observada en las hembras es consistente con el efecto descrito anteriormente por nosotros al comparar entre ambos sexos²¹ en donde el T_{pf} de las hembras fue significativamente mayor que el de los machos.

Esta situación se repitió al observar distintas variables de los PA tanto en hembras como machos: la DPA_{90} de las hembras adultas fue mayor que la de las jóvenes y la DPA_{30} y DPA_{50} de los machos adultos presentaron menor duración que el de los jóvenes. Esta menor duración de la DPA_{30} de los machos también fue observada por Pham al compararla entre machos y hembras¹¹. Este acortamiento en la duración del potencial de acción (especialmente al 30%) ha sido también descrito en conejos hembras

castradas cuando fueron suplementadas con dihidrotestosterona con respecto a hembras castradas y hembras castradas suplementadas con estradiol²².

La modulación de la DPA ocurre principalmente como consecuencia de un balance entre las corrientes despolarizantes y repolarizantes responsables de la generación del PA. En este sentido, diversos trabajos experimentales han mostrado recientemente un posible efecto de las hormonas sexuales sobre las corrientes de potasio y calcio. Se han observado diferencias en las corrientes repolarizantes de potasio (I_K e I_{K1}) entre conejos machos y hembras adultos, siendo ambas corrientes mayores en los machos que en las hembras⁹.

La mayor duración en la DPA_{90} en las hembras adultas con respecto a la de las jóvenes, como se muestra en la Fig. 4, posiblemente se deba a una inhibición, por parte de algún factor gonadal, de las corrientes repolarizantes de potasio (en especial I_K). En este sentido se ha descrito una prolongación en la DPA de conejos hembras debida a la acción de las hormonas gonadales femeninas^{10, 23}. Es probable que esta inhibición y la consiguiente prolongación de los PA, contribuya a la aparición de Torsión de Punta inducida por drogas².

Por otro lado, el acortamiento del PA observado en machos ha sido comunicado previamente en otras especies^{24, 25} como consecuencia, tanto de un aumento de la corriente I_K lenta, como de una inhibición de la I_{Ca} , provocando una menor duración de los PA.

La mayor duración del intervalo T_{pf} en las hembras adultas estaría asociada a los incrementos en la DPA_{90} observados en hembras adultas; dicho fenómeno podría producir diferencias en la dispersión a nivel transmural¹¹. Este efecto también estaría vinculado con el aumento de riesgo de Torsión de Puntas encontrada en el sexo femenino²⁶. Por el lado de los machos, la mayor duración del intervalo JT_p podría vincularse a los incrementos en las DPA_{30} y DPA_{50} observadas en el mismo grupo experimental; estos resultados son concordantes con los informados anteriormente en humanos²⁷.

El hecho que las hembras adultas presenten un intervalo T_{pf} significativamente mayor que las hembras jóvenes, y que estas diferencias se mantengan para las hembras castradas estaría sugiriendo que estamos en presencia de un efecto provocado por la acción de algún factor gonadal. Dicho fenómeno se observa también a nivel del PA, ya que en las hembras adultas la DPA_{90} es significativamente mayor que la correspondiente al de hembras jóvenes y castradas. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por Tanabe et al¹⁰ los cuales observaron en células aisladas de cobayo una prolongación en el potencial de acción pocos minutos después del agregado de estrógenos.

Dado que los conejos hembra no presentan ciclo menstrual, sus niveles plasmáticos de estradiol permanecen constantes y bajos. Estos niveles no se ven afectados ni

por la madurez sexual ni por la castración, tal como fue observado por nosotros y por otros autores^{11, 13, 21}. Este hecho no nos permite asegurar que sea esta hormona gonadal la responsable de los efectos observados en las hembras, si bien su rol no puede ser descartado. Una posible explicación sería la existencia de diferencias en los niveles plasmáticos de estradiol en los distintos grupos experimentales, tal como ha sido sugerido por Fullop et al⁶, pero dado que estos niveles son muy bajos no es posible su correcta evaluación por los métodos usuales de determinación. Otra posibilidad sería la mencionada por Philp et al²⁰, quienes sugieren que las diferencias observadas en las hembras adultas no se deben a una mayor concentración plasmática de estradiol, sino a una mayor efectividad de dicha hormona.

Por el contrario, en los machos la castración no revierte dichos efectos. En el ECG de superficie los intervalos JT_p , JT_p y QT_f de los machos castrados no presentan diferencias significativas con respecto a los de los adultos, situación que se repite a nivel del PA con la DPA_{30} y la DPA_{50} . Estos resultados sugieren que dichas diferencias son provocadas por factores no hormonales. Resultados vinculados a efectos no hormonales han sido informados solamente al 30% de la DPA ¹¹, los cuales describen una menor duración de los mismos en los machos, que persiste luego de la castración. Por otro lado, estos resultados son opuestos a los encontrados por otros autores^{24, 25}, quienes describen que la testosterona aumenta la corriente I_{Ks} e inhibe I_{Ca} provocando una prolongación del PA. Nosotros hemos observado el mismo efecto, pero en este caso vinculado a algún factor no hormonal.

Es interesante observar que las diferencias obtenidas en la DPA de las hembras se hacen significativas a intervalos de estimulación mayores a 400 milisegundos (es decir, a frecuencias de estimulación menores a 150 latidos/minuto), resultados que también han sido observados por nosotros y otros autores^{9, 21, 22}. Esto podría indicar que la bradicardia sería necesaria para revelar las diferencias entre sexos, tal como fue sugerido por Coker et al⁴.

Por último, se encontraron diferencias significativas en el V_m y el dV/dt_m de los machos, como se observa en la Fig. 4. El dV/dt_m de los machos jóvenes es significativamente mayor que el de los machos adultos y esta diferencia no es revertida luego de la castración, sugiriendo que es un efecto debido a factores no hormonales. Por el lado del V_m los machos adultos presentan valores significativamente más negativos que los que se observan tanto en machos jóvenes como en castrados. Estos resultados sugieren que estas diferencias son debidas a la acción de las hormonas masculinas, probablemente por influencia sobre alguna de las corrientes de membrana involucradas en la regulación del potencial de reposo.

Agradecimientos: Los autores agradecen al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

por su respaldo al desarrollo de este trabajo de investigación. Pedro D. Arini agradece a la Fundación Florencio Fiorini por el aporte financiero otorgado.

Conflictos de intereses: Los autores declaran que este trabajo no presenta conflictos de intereses de ningún tipo.

Bibliografía

1. Bidoggia H, Maciel J, Capalozza N, et al. Sex-dependent electrocardiographic pattern of cardiac repolarization. *Am Heart J* 2000; 140: 430-6.
2. Abi-Gerges N, Philip K, Pollard C, Wakefield I, Hammond T, Valentin J. Sex differences in ventricular repolarization: from cardiac electrophysiology in Torsades de Pointes. *Fundamen Clin Pharmacol* 2004; 18: 139-51.
3. Wolbrette D, Naccarelli G, Curtis A, Lehmann M, Kadish A. Gender differences in arrhythmias. *Clin Cardiol* 2002; 25: 49-56.
4. Coker SJ. Drugs for men and women - How important is gender as a risk factor for TdP? *Pharmacol Ther* 2008; 186-94.
5. Bidoggia H, Maciel J, Capalozza N, et al. Sex differences on the electrocardiographic pattern of cardiac repolarization. Possible role of testosterone. *Am Heart J* 2000; 140: 678-83.
6. Fullop L, Banyasz T, Szabo G, et al. Effects of sex hormones on ECG parameters and expression of cardiac ion channels in dogs. *Acta Physiol* 2006; 188: 163-71.
7. Pham T, Rosen M. Sex, hormones and repolarization. *Cardiovasc Research* 2002; 53: 740-51.
8. Cheng J. Evidences of the gender-related differences in cardiac repolarization and the underlying mechanisms in different animal species and human. *Fund Clin Pharmacol* 2006; 20: 1-8.
9. Liu X, Katchman A, Drici M, et al. Gender difference in cycle length-dependent QT and potassium current in rabbits. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285: 672-9.
10. Tanabe S, Hata T, Hiraoka M. Effects of estrogen on action potential and membrane currents in guinea pig ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1999; 277: H826-H833.
11. Pham T, Sosunov E, Gainullin R, Danilo P, Rosen M. Impact of sex gonadal steroids on prolongation of ventricular repolarization and arrhythmias induced by IK-blocking drugs. *Circulation* 2001; 103: 2207-12.
12. Bertrán G, Valverde E, Arini P. ¿Son las hormonas sexuales las responsables de las diferencias observadas en la actividad eléctrica cardiaca entre hembras y machos? *Medicina (Buenos Aires)* 2006; 66: 65-6.
13. Pham T, Robinson R, Danilo P, Rosen M. Effects of gonadal steroids on gender-related differences in transmural dispersion of L-type calcium current. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 752-62.
14. de Turckheim M, Berger M, Jean-Faucher C, Veyssiere G, Jean C. Changes in ovarian oestrogens and in plasma gonadotrophins in female rabbits from birth to adulthood. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983; 103:125-30.
15. Berger M, Jean-Faucher C, de Turckheim M, et al. Testosterone, luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in plasma of rabbits from birth to adulthood. Correlation with sexual and behavioural development. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1982; 99: 459-65.
16. Berger M, Corre M, Jean-Faucher C, et al. Changes in the testosterone to dihydrotestosterone ratio in plasma and testes of maturing rabbits. *Endocrinology* 1979; 104: 1450-4.
17. Meyer CR, Keiser HN. Electrocardiogram baseline noise

- estimation and removal using cubic spline and state-space computation techniques. *Comput Biomed Res* 1977; 10: 459-470.
18. Pan J, Tompkins WJ. A real-time QRS detection algorithm. *IEEE Trans Biomed Eng* 1985; 32: 230-6.
 19. Arini P, Bertrán G, Valverde E, Laguna P. T-wave width as an index for quantification of ventricular repolarization dispersion: Evaluation in an isolated rabbit heart model. *Biomed Signal Process Control* 2008; 3: 67-77.
 20. Philp K, Hussain M, Byrne N, Diver M, Hart G, Coker S. Greater antiarrhythmic activity of acute 17 β -estradiol in female than male anaesthetized rats: correlation with Ca^{2+} channel blockade. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 233-42.
 21. Valverde E, Biagetti M, Bertran G, Arini P, Bidoggia H, Quinteiro R. Developmental changes of cardiac repolarization in rabbits: Implications for the role of sex hormones. *Cardiovasc Res* 2003; 57: 625-31.
 22. Hara M, Danilo P, Rosen M. Effects of gonadal steroids on ventricular repolarization and on the response to E-4031. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285: 1068-72.
 23. James A, Choisy S, Hancox J. Recent advances in understanding sex differences in cardiac repolarization. *Prog Biophys Mol Biol* 2007; 94: 265-319.
 24. Bai C, Kurokawa J, Tamagawa M, Nakaya H, Furukawa T. Nontranscriptional regulation of cardiac repolarization currents by testosterone. *Circulation* 2005; 112: 1701-10.
 25. Er F, Michels G, Brandt M, Khan, et al. Impact of testosterone on cardiac L-type calcium channels and Ca^{2+} sparks: acute actions antagonize chronic effects. *Cell Calcium* 2007; 41: 467-77.
 26. Lu H, Remeysen P, Somers K, Saels A, De Clerk F. Female gender is a risk factor for drug-induced long QT and cardiac arrhythmias in an in vitro rabbit model. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001; 12: 538-45.

Situada en su rango de actividad espiritual secundaria, la política o pensamiento de lo útil es una saludable fuerza de que no podemos prescindir. Si se me invita a escoger entre el comerciante y el bohemio, me quedo sin ninguno de los dos. Mas cuando la política se entroniza en la conciencia y preside toda nuestra vida mental, se convierte en un morbo gravísimo, La razón es clara. Mientras tomemos lo útil como útil, nada hay que objetar. Pero si esta preocupación por lo útil llega a constituir el hábito central de nuestra personalidad, cuando se trate de buscar lo verdadero tenderemos a confundirlo con lo útil. Y esto, hacer de la utilidad la verdad, es la definición de la mentira. El imperio de la política es, pues, el imperio de la mentira.

José Ortega y Gasset (1883-1955)

Verdad y perspectiva (1916). El Espectador, tomo I, 1916. En:
<http://www.ensayistas.org/antologia/XXE/ortega/>;
 consultado el 10-9-2008

Sobre la apendicitis aguda: Amyand, Fitz, y unos pocos más

Comencemos con la historia de la apendicitis aguda incluida en los textos de cirugía. En el primer texto a nuestro alcance leemos:

“Existen informes aislados de apendicectomías desde 1736 en adelante, cuando Amyand extirpó con éxito de un saco herniario un apéndice que se había perforado con un alfiler. De 1581 en adelante también hay muchas publicaciones de la enfermedad supurativa mortal de la región cecal que, sin embargo, solía denominarse ‘peritiflitis’. La identificación de la apendicitis como entidad clínica y patológica para la cual se requiere tratamiento quirúrgico data de 1886 cuando Reginald Fitz, profesor de anatomía patológica en Harvard, leyó un artículo en la primera reunión de la *Association of American Physicians* denominado [...] Poco después Mc Burney describió las manifestaciones clínicas de la apendicitis aguda temprana antes de su rotura, incluyendo el punto de hipersensibilidad abdominal máxima, y una incisión ‘hecha en la pared abdominal en casos de apendicitis’¹.

¿Quién era Amyand? ¿Qué vio y qué hizo? ¿Quién era Reginald Heber Fitz? ¿Cómo un patólogo definió la entidad que requería un diagnóstico e intervención quirúrgica inmediata? ¿Cómo se convencieron los médicos de lo que sostenía Fitz? Trataremos de responder las preguntas enfocándonos en los trabajos originales de Amyand y Fitz. No añadiremos a las revisiones que tratan el tema con extensión, y mayor o menor fortuna.

Claudius Amyand (ca. 1681-1740) nació en París, en una familia de hugonotes de la *Santoigne* que huyó a Inglaterra. Se naturalizaron ingleses en 1698. Amyand sirvió como cirujano militar en Flandes, en 1716 fue incorporado a la *Royal Society*. Fue cirujano en el *St. George's Hospital* y *Sergeant-Surgeon* (*Surgeon-in-Ordinary*) (1715-1740) del rey George I (1714-1727) y luego de George II (1727-1760)². Publicó observaciones sobre casos poco comunes de su práctica en las *Philosophical Transactions*. En esta nota nos interesa la primera parte de la titulada *Of an Inguinal Rupture, with a Pin in the Appendix Coeci, Incrusted with Stone* [hernia de Amyand]; *And Some Observations on Wounds in the Guts*³.

Amyand relata que el 8 de octubre de 1735 ingresó al *St. George's Hospital* Hanvil Anderson, un chico de 11 años, que desde la infancia tenía una hernia escrotal, complicada con una fístula entre el escroto y el muslo que drenaba gran cantidad de una materia “de lo menos amable” (*unkindly* = materia fecal) y que para curarla era necesario curar la hernia. Lo operó el siguiente 6 de diciembre. La operación fue difícil y laboriosa por sus extraños hallazgos. El tumor estaba compuesto en su mayor parte por epiplón, tenía el tamaño de una manzana (*pippin apple*) y en él se encontraba el apéndice cecal perforado en la punta por un alfiler incrustado en una concreción calcárea; por la perforación salía materia fecal cada vez que se movía el alfiler adherido al epiplón. Alrededor, un absceso incluía el conducto deferente y el testículo contenidos en el saco herniario. Amyand no sabía qué hacer con el intestino perforado que reconoció, al final, como el apéndice cecal: “contraído, carnoso y duplicado”. Tras una complicada disección, extendida a la cavidad abdominal, reseco el epiplón, separó los vasos, el deferente y el testículo y, de acuerdo a la opinión de los asustados concurrentes, decidió amputar el anormal apéndice tras una ligadura en la base. Retornó el intestino a la cavidad abdominal, dejó el resto de los elementos en el saco escrotal y reseco la fístula. La incisión se mantuvo abierta con una compresa. La operación duró casi media hora y fue “tan dolorosa para el paciente, como laboriosa para mí”. El muchacho sobrevivió

a la operación y al tratamiento posoperatorio. Al décimo día cayó la ligadura del apéndice, la perforación estaba curada y la incisión, sujeta a una fuerte y constante presión sobre ella, curó por segunda. Al mes el chico fue dado de alta, se le indicó usar un braguero para evitar la eventración y recidiva de la hernia. La fístula curó, la hernia recidivó a los seis meses. Hasta aquí el descolorido resumen de una detallada y vívida historia clínica y parte quirúrgico que finaliza con una nota que dice: “El epiplón y el intestino resecado, con el alfiler que lo perfora, están en el repositorio de la *Royal Society*”.

Dice uno de los biógrafos de Reginald Heber Fitz (1843-1913): “Fitz no fue un cirujano. Primero fue un patólogo y después un internista”⁴. Nació en una vieja y tradicional familia de capitanes de mar de Nueva Inglaterra. Estudió en Harvard, graduado pasó a Viena, luego un año a Berlín con Virchow. Allí publicó, en *Virchows Archiv*, un artículo sobre bronquiectasias. Visitó las clínicas de Cornil en París, de Murchison en Londres y de Lister en Edimburgo. De vuelta a Harvard fue un estimulante, sarcástico y generoso docente, “microscopista” del *Massachusetts General Hospital*, *Shattuck Professor of Pathology* de la *Harvard Medical School*, y, después, *Hersey Professor of the Theory & Practice of Physic* (medicina interna). En el prólogo de una revista dedicada a Fitz por sus discípulos cuando cumplió 65 años dice Stone, uno de ellos: “El trabajo que Fitz ha hecho durante el período activo de su vida ha sido mayormente crítico y judicial, aunque siempre con una tendencia constructiva”⁵.

En la primera reunión de la *Association of American Physicians*, Washington, 1886, Fitz leyó una conferencia de 29 páginas, más nueve de la discusión que la sigue, titulada: *Perforating inflammation of the vermiform appendix; with special reference to its early diagnosis and treatment*⁶.

Fitz señala el desacuerdo existente en relación a la inflamación de ciego y apéndice con la peritonitis y la peritiflitis, y la vital importancia del oportuno y adecuado tratamiento que se pospone hasta perder la esperanza de solución. Por ello cree que la consideración crítica de un gran número de casos de perforación del apéndice puede servir para destacar los caracteres centrales del diagnóstico y tratamiento. Sigue con una consideración histórico-crítica de los trabajos publicados sobre el llamado flemón o absceso de fosa ilíaca y las llamadas tiflitis y peritiflitis. Para resolver el nudo de la cuestión, ya en la tercera página dice que el patólogo se diferencia del clínico porque “busca establecer el sitio y causa de las enfermedades” y encuentra que “en los casos más fatales de tiflitis el ciego está intacto y el apéndice perforado”. Y ve que la peritiflitis es un “absceso enquistado”. Más aún, que en la mayoría de los abscesos enquistados, incluso detrás del ciego, se encuentra un apéndice inflamado o que se comunica con éste, y que la comunicación con el ciego es el resultado y no la causa del absceso. Dice: “Como la peritonitis circumscripta es un simple evento, aunque usualmente el más importante, en la historia de la inflamación del apéndice, es preferible usar el término *apendicitis* (la bastardilla es nuestra) para expresar la condición primaria”.

Fitz sostiene su proposición con las autopsias de 257 casos de perforaciones del apéndice que compara con 209 casos de tiflitis y peritiflitis. Sobre la etiología de la *apendicitis* sus consideraciones son casi las mismas que aún se discuten. Presenta sus hallazgos en tablas donde compara la edad, localización, características del dolor, síntomas que lo acompañan e intenta, por el tipo de dolor, determinar el día de la perforación, la elevación de la temperatura, el embotamiento y la palpación de un tumor en la zona, la aparición de dolor abdominal difuso, la distensión (*tympanites*) y en qué día de la evolución aparecen y el tiempo de la muerte desde el comienzo de los síntomas.

La muerte en la *apendicitis* es por shock después de la peritonitis y el proceso puede extenderse al mesenterio. En 11 casos de los 257 Fitz encontró *pileflebitis*. Fitz no duda de que no todas las *apendicitis* perforadas son fatales. El número (180) de las llamadas tiflitis y peritiflitis, aunque no una evidencia absoluta, lo sugiere. De estas, 58 terminaron en resolución (32%), 33 por evacuación espontánea (18%) y 89 por operación (50%).

Las conclusiones, en las *apendicitis* perforadas, son claras: la *apendicitis* perforada ocurre con mayor frecuencia en muy jóvenes (10-20 años) y adultos jóvenes (20-30 años), especialmente en varones (no hay tabla que indique el sexo). El dolor abdominal brusco es el primer y más constante síntoma de la

perforación, en adultos aparentemente sanos, es intenso, pocas veces leve y ocasionalmente acompañado de escalofríos, náusea y vómitos; la localización usual es en la fosa ilíaca derecha. La fiebre, no muy alta, sigue en frecuencia al dolor. El embotamiento, la tumefacción y la palpación de un tumor en la fosa ilíaca derecha es de gran valor diagnóstico y, con tratamiento adecuado, modifica favorablemente el pronóstico. Fitz sostiene que no debe esperarse la resolución espontánea y conviene la intervención inmediata después de las 24 horas del comienzo del dolor. En el tratamiento recuerda que: “Un catártico o un laxante puede ser pedido por el paciente o sus amigos, y una enema se piensa que puede ser una ayuda diagnóstica. Debe recordarse que estos pueden ser los medios de excitar el comienzo de una peritonitis generalizada”. Fitz es enfático cuando dice: “Ningún cirujano debe dudar en dar una oportunidad de vivir cuando se ha satisfecho que ocurrió la perforación y que la peritonitis es inminente”.

Fitz termina la conferencia con estas afirmaciones: “La vital importancia del diagnóstico temprano de la apendicitis perforada es obvia. El diagnóstico, en la mayoría de los casos, es comparativamente fácil. El eventual tratamiento por laparotomía es generalmente indispensable. Síntomas urgentes demandan la inmediata exposición del apéndice perforado, después de la recuperación del shock, y su tratamiento de acuerdo con los principios quirúrgicos. Si la espera se justifica, el absceso resultante, por regla intraperitoneal, debería ser incidido tan pronto como sea evidente. Esto es usualmente en el tercer día después de la aparición de los primeros síntomas característicos de la enfermedad”.

Son confusas, para un lector del 2010, las tiflitis y peritífritis, aunque Fitz sugiere que muchas son apendicitis no fatales resueltas de una u otra forma. Fitz dejó pocas cosas por hacer a los médicos de su tiempo.

Charles Heber McBurney (1845-1913), profesor de cirugía en el *College of Physicians and Surgeons (Columbia University)* de New York describió el sitio preciso del dolor en 1889 y la incisión adecuada para exponer y extirpar el apéndice inflamado en 1894⁷.

Sir Frederick Treves (1893-1923), cirujano, escritor e historiador inglés, contribuyó a la difusión de las ideas de Fitz. Su influyente conferencia *Relapsing typhilitis treated by operation*, cuyo texto recibió la *Royal Medical and Chirurgical Society* en setiembre de 1887, se leyó en febrero del 1888 y se publicó en el mismo año⁸. Treves fue quien, en 1902, operó de apendicitis a Eduardo VII tres días antes de la programada coronación, desde luego pospuesta, y Treves fue quien cuidó a Joseph Merrick, el Hombre Elefante⁹.

Los médicos actuales tal vez prefieran estar al día en el tema de esta nota que a la historia. Para eso nos atrevemos a recomendar revisiones de los últimos 10 años, por ejemplo: la de *Radiology*¹⁰, la del *British Medical Journal*¹¹. Para los prácticos nada mejor que las revisiones de *Postgraduate Medicine*¹² y del *American Family Physician*¹³. A quienes les gusta lo exótico la del *Hong Kong Med J*¹⁴, tiene ideogramas del nombre de los autores y una infografía secreta. La revisión más numerosa en casos es de 1997, en el *Annals of Surgery*, 4 950 apendicectomías¹⁵. Y está, por supuesto, *Up to date*. Pero el estudio de Fitz resiste la injuria del tiempo. Para terminar, un cirujano ruso, Leonid Ivanovich Rogosov, en 1961, en una base de la Antártida, se practicó a sí mismo una apendicectomía exitosa¹⁶. Es cuestión de animarse nomás.

Juan Antonio Barcat

e-mail: jabarcat@yahoo.com.ar

1. Schwartz SI. En: Schwartz SI (Editor en jefe). Principios de cirugía. 3ra. Edición en castellano. México D.F: Interamericana-McGraw-Hill, 1995. Volumen 2, Capítulo 27, p 1347-58. Traducción de Jorge Orizaba Samperio de *Principles of Surgery, 6th. Edition*. New Cork: McGraw-Hill, 1994.
2. Claudius Amyand. The Twickenham Museum. <http://www.twickenham-museum.org.uk/>; consultado el 30-5-10.

3. Amyand C. Of an Inguinal Rupture, with a Pin in the Appendix Coeci, Incrusted with Stone; And Some Observations on wounds in the guts. *Philos Trans R Soc Lond* 1736; 39: 329-42.
4. Loveland JE. Reginald Heber Fitz, the exponent of appendicitis. *Yale J Biol Med* 1937; 9: 509-20.
5. Stone AK. Medical papers dedicated to Reginald Heber

- Fitz from his pupils [...]. Reprinted from *Boston Med Surg J* 1908; CLVIII: 7-12. En: <http://www.archive.org/stream/medicalpapersde01unkngoog#page/n5/mode/1up>; consultado el 10-5-10.
6. Fitz RH. Perforating inflammation of the vermiform appendix; with special reference to its early diagnosis and treatment. *Trans Assoc Am Physicians* 1886; 1:107-44.
 7. Parquet R. Charles Heber McBurney (Reseñas históricas). *Acta Gastroenterol Latinoam* 2009; 39: 102.
 8. Treves F. Relapsing typhlitis treated by operation. *Med Chir Trans* 1888; 71: 165-72.
 9. Mirilas P, Skandalakis JE. Not just an appendix: Sir Frederick Treves. *Arch Dis Child* 2003; 88: 549-53
 10. Birnbaum BA, Wilson SR. Appendicitis at the Millennium. *Radiology* 2000; 215: 337-48.
 11. Humes DJ, Simpson J. Acute appendicitis (Clinical review). *BMJ* 2006; 333: 530-4.
 12. Merlin MA, Shah CN, Shiroff AM. Evidence-based appendicitis: the initial work-up. *Postgrad Med* 2010; 122:189-95. (Abstract)
 13. Ebell MH. Point of Care Guides. Diagnosis of appendicitis. Part I. History and physical examination. *Am Fam Physician* 2008; 77: 828-30. Part II. Laboratory and imaging testing. *Am Fam Physician* 2008; 77: 1153-55.
 14. Ma KW, Chia NH, Yeung HW, Cheung MT. If not appendicitis, then what else can it be? A retrospective review of 1492 appendectomies. *Hong Kong Med J* 2010; 16: 12-7.

FE DE ERRATAS

Influencia de la madurez sexual y la castración sobre la actividad eléctrica cardíaca en conejos machos y hembras. *Medicina (Buenos Aires)* 2010; 70: 347-54. Autores: Gabriela Y. Eizikovits, Carolina Casal, Pedro D. Arini, Guillermo C. Bertrán.

La Fig. 5 que aparece no es la que corresponde y debe ser reemplazada por la siguiente

